

University of Groningen

## **Towards treatment of cholestatic liver disease in children via interference with transcriptional regulation of hepatic transport systems**

Mulder, Jaap

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2009

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Mulder, J. (2009). *Towards treatment of cholestatic liver disease in children via interference with transcriptional regulation of hepatic transport systems*. s.n.

### **Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### **Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

De lever heeft veel en zeer uiteenlopende functies. Naast het ontgiften van afvalstoffen en de verwijdering hiervan uit het lichaam speelt de lever een centrale rol in de stofwisseling en maakt ze een scala aan stoffen betrokken bij o.a. de bloedstolling, afweerreacties en hormoonsystemen. Een andere zeer belangrijke functie is de productie van gal. Door de levercellen (“hepatocyten”) geproduceerde gal wordt via een gespecialiseerd systeem van galweggetjes en galwegen naar de dunne darm geleid. Gal bevat hoge concentraties van zogenaamde galzouten. Dit zijn zeepachtige stoffen, die noodzakelijk zijn voor een optimale vertering en opname van voedingsstoffen door de darm, m.n. van vetten en vet-oplosbare stoffen (bijv. vitamines A, D, E en K). Naast galzouten bevat gal ook afvalstoffen die langs deze route uiteindelijk via de ontlasting uitgescheiden kunnen worden.

Wanneer de productie van gal door de lever of de afvoer hiervan naar de darm gestoord is, spreekt men van “cholestase”. Dit woord is afgeleid van de Griekse woorden χολη (= “gal”) en στασις (= “stilstaan”). De oorzaak hiervan kan zowel in de levercellen zelf (“hepatocellulaire cholestase”) als in de afvoerende galwegen (“obstructieve cholestase”) gelegen zijn. Als gevolg hiervan ontstaat er een tekort aan galzouten in de darm, dat zal leiden tot een verstoorde opname van vetten en vet-oplosbare stoffen en mogelijk tot een tekort aan (essentiële) voedingsstoffen. Daarnaast zullen stoffen die normaal gesproken in de gal uitgescheiden worden, zich nu in de lever en vervolgens ook in de rest van het lichaam ophopen. Het meest bekende gevolg hiervan is het ontstaan van geelzucht, waarbij bilirubine (een afbraakproduct van hemoglobine uit rode bloedcellen) zich in de huid en in het oogwit ophoopt. Zoals gezegd zijn galzouten zeepachtige stoffen. Net zoals zij in staat zijn om in de darm vetten te doen “oplossen”, kunnen zij dit, mits de ophoping voldoende is, ook doen in de lever zelf. Hierdoor kunnen levercellen beschadigd raken en te gronde gaan. Dit leidt vervolgens weer tot een vermindering van de functie van de lever als geheel, o.a. leidend tot verminderde productie van gal en eiwitten en verminderde ontgiftingsactiviteit. Men kan dan spreken van cholestatische leverziekte.

Bovenstaande maakt duidelijk dat galzouten twee gezichten hebben. Aan de ene kant zijn ze onmisbaar voor de opname van essentiële voedingsbestanddelen, maar aan de andere kant zijn ze ook potentieel schadelijk voor de lever/het lichaam. Daarom dient de lokale concentratie van galzouten nauwkeurig gereguleerd te worden. Dit gebeurt op verschillende manieren, waarvan *transcriptionele regulatie* er één is. Transcriptie is het proces, waarbij een gen (DNA) wordt “afgelezen”. Hierbij wordt mRNA gevormd dat vervolgens weer wordt vertaald in een eiwit met een bepaalde fysiologische functie. Levercellen kunnen zichzelf beschermen door de transcriptie van genen die coderen voor eiwitten betrokken bij het transport van galzouten of de aanmaak hiervan te reguleren. Onderzoek gedurende het afgelopen decennium heeft aangetoond dat nucleaire receptoren (NRs) een belangrijke rol spelen bij deze transcriptionele regulatie van de galzouthuishouding. NRs zijn eiwitten, die door

binding van meer of minder specifieke stoffen (zgn. liganden) “aan” gezet kunnen worden om genen tot expressie te laten komen. Ze worden daarom ligand-geactiveerde transcriptiefactoren genoemd. Bekende voorbeelden van NRs zijn de klassieke hormoonreceptoren, bijv. die voor bijnierschorschormonen en geslachtshormonen. Meer recent is echter duidelijk geworden dat de familie van NRs beduidend groter is en ook receptoren omvat, die een rol spelen bij de regulering van processen binnen individuele cellen. De farnesoid X receptor (FXR) is bijvoorbeeld geïdentificeerd als NR, waarvan de activiteit gereguleerd wordt door galzouten. Wanneer de concentratie van galzouten binnen een levercel stijgt, zal geactiveerde FXR de expressie van genen betrokken bij de opname en aanmaak van galzouten remmen en tegelijkertijd die van genen betrokken bij de uitscheiding ervan te verhogen. Het netto-effect hiervan zal zijn dat de cel beschermd wordt tegen een overmaat aan galzouten. FXR fungeert dus als een “thermostaat” om de concentratie galzouten binnen de levercel binnen normale grenzen te houden. Naast FXR zijn ook andere NRs betrokken bij de regulering van genen die een rol spelen bij de galzouthuishouding en galvorming, bijv. de liver X receptor (LXR) en de peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs).

Zoals gezegd kent cholestase diverse oorzaken, die grofweg ingedeeld kunnen worden in de eerder genoemde categorieën van hepatocellulaire en obstructieve oorzaken. Bekende voorbeelden van cholestatische leverziekten op de kinderleeftijd zijn o.a. galgangatresie (ook wel biliare atresie genoemd) en parenterale voeding-geassocieerde cholestase. Bij galgangatresie ontstaat door een nog onopgehelderd proces kort na de geboorte een afweerreactie gericht tegen de galgangen, die vervolgens beschadigd en geblokkeerd raken en daarmee de galvloed verhinderen. Bij parenterale voeding-geassocieerde cholestase gaat de toediening van voedingsstoffen direct in de bloedbaan via een infuus (parenteraal, = “buiten de darm”) gepaard met een verstoorde aanmaak van gal. Het mechanisme hierachter is vooralsnog niet opgehelderd, maar het treedt vooral op bij te vroeg geboren baby's of bij baby's met een “korte darm” t.g.v. aangeboren afwijkingen en/of operatieve ingrepen. Er bestaan verschillende behandelingsmethoden voor cholestatische leverziekten, zowel medicamenteus als chirurgisch, maar helaas hebben niet alle patiënten hier (blijvend) baat bij en is het uiteindelijk vaak noodzakelijk om over te gaan tot levertransplantatie. Hoewel dit een levensreddende ingreep kan zijn, is het aantal beschikbare donorlevers beperkt en gaat levertransplantatie nog altijd gepaard met een aanzienlijke mate van ziektelast en sterfte. Er blijft dus behoefte bestaan aan nieuwe behandelingsmogelijkheden. In de studies beschreven in dit proefschrift is onderzocht in hoeverre het mogelijk is om met gebruik van NR-liganden in te grijpen bij één type cholestatische leverziekte, namelijk ontsteking-geïnduceerde cholestase (Eng: *inflammation-induced cholestasis* (IIC)).

In **hoofdstuk 2** wordt stilgestaan bij het verband tussen NRs en IIC. De mechanismen van galvorming en de werkingsmechanismen van NRs worden beschreven. Naast hun rol als “thermostaten” binnen levercellen zijn NRs ook van belang voor

de basale expressie van verschillende transporteiwitten en dus voor de normale galvorming. Aangezien ontstekingsreacties, bijvoorbeeld op basis van een bacteriële infectie zoals sepsis of een urineweginfectie, aanleiding kunnen geven tot verminderde activiteit van NRs, is het niet verwonderlijk dat IIC (deels) wordt gemedieerd door verminderde NR-activiteit. Echter, de eigenschap van NRs dat hun activiteit gereguleerd wordt door liganden, biedt ook de mogelijkheid om stoffen te zoeken of ontwerpen, die de activiteit van NRs krachtig en selectief kunnen beïnvloeden, maar die qua chemische structuur afwijken van de natuurlijke liganden. Dergelijke stoffen zouden mogelijk gebruikt kunnen worden als medicijn. Eén voorbeeld van zo'n stof zou een niet-galzout FXR-ligand kunnen zijn. Hiermee zou FXR-activatie versterkt kunnen worden zonder dat er een verder verhoogde, en daarmee nog meer schadelijke, galzoutconcentratie hoeft te bestaan. Door de levercel daarmee al in een eerder stadium te laten denken dat de galzoutconcentratie te hoog is, kunnen mechanismen om de cel te beschermen eerder in gang gezet worden.

Verschillende NRs blijken ook ontstekingsremmende effecten te hebben, bijv. PPAR $\gamma$  en LXR. Deze effecten zijn voornamelijk aangetoond in zgn. macrofagen, afweercellen die ontstaan uit witte bloedcellen. Een subgroep van deze macrofagen bevindt zich permanent in de lever, zgn. Kupffercellen (KC). KCs spelen een belangrijke rol bij het ontstaan van IIC, doordat ze in reactie op verschillende infectieuze/toxische stimuli een verscheidenheid aan ontstekingsmediatoren uitscheiden. Deze zgn. cytokines, grijpen vervolgens aan op de levercellen zelf, wat leidt tot verstoorde galvorming. Gebaseerd op de hypothese dat remming van de ontstekingsreactie in KCs door behandeling met liganden van PPAR $\gamma$  en LXR in staat zou kunnen zijn om het ontstaan van IIC te kunnen stoppen, voerden we een aantal proefdier- en celweekstudies uit, welke worden beschreven in **hoofdstukken 3-5**. Als model voor IIC werden muizen geïnjecteerd met lipopolysaccharide (LPS), een component van de celwand van Gram-negatieve bacteriën, die een krachtige ontstekingsreactie kan opwekken in m.n. de lever. Als gevolg hiervan wordt o.a. de genexpressie van verschillende galzouttransporteiwitten en andere eiwitten betrokken bij de aanmaak van gal geremd. In **hoofdstuk 3** worden studies met PPAR $\gamma$ -ligand, rosiglitazon, beschreven. Dit middel blijkt de cascade leidend tot IIC deels te kunnen remmen, maar niet op het niveau van de KCs. Het lijkt vooral te werken in de levercellen zelf en blijkt daarin de hoeveelheid van de NR retinoid X receptor (RXR)- $\alpha$  in de kern te behouden. RXR $\alpha$  is een bijzondere NR, aangezien deze noodzakelijk is voor de andere NRs om transcriptioneel actief te kunnen zijn. T.g.v. ontsteking wordt RXR $\alpha$  snel uit de kern verwijderd, waarmee de basale expressie van diverse genen geremd wordt. Behoud van RXR $\alpha$  in de kern tijdens ontsteking door voorbehandeling met rosiglitazon gaat dan ook gepaard met gedeeltelijk behoud van basale genexpressie. In **hoofdstuk 4** wordt getoond dat ook voorbehandeling met een LXR-ligand, nl. T0901317, in staat blijkt om deze genexpressies op peil te houden en dat dit ook in de levercel zelf werkt. Dit gaat echter niet gepaard met behoud van RXR $\alpha$ , maar T0901317 lijkt wel de effecten van een andere transcriptiefactor (geen NR), nl. NF-

κB, te remmen. Het grote nadeel van T0901317 is echter dat het als zeer ongewenste bijwerking heeft dat het de levercel aanzet om vetzuren aan te maken. Hierdoor ontstaat sterke vervetting van de lever. Vanwege deze bijwerking en het schijnbaar ontbreken van een ontstekingsremmend effect van T0901317 in de KCs werd vervolgens onderzocht of het toch mogelijk was om de ontstekingsreactie in deze cellen met T0901317 te remmen. Deze studies worden in **hoofdstuk 5** beschreven. Hiervoor werden uit rattenlevers geïsoleerde KCs in kweek gebracht en vervolgens met LPS gestimuleerd. Deze ontstekingsreactie bleek inderdaad deels geremd te kunnen worden door T0901317. Ondanks dat het effect van T0901317 minder krachtig was dan dat van dexamethason, een veel gebruikte ontstekingsremmer, geven onze resultaten aan dat KC-specifieke LXR-liganden of liganden die daar door gebruik van farmacologische technieken in afgeleverd worden, mogelijk therapeutisch ingezet kunnen worden om in te grijpen in IIC.

Naast effecten op het transport van galzouten hebben ontstekingsprocessen ook effecten op het transport van andere galbestanddelen, bijvoorbeeld cholesterol. In **hoofdstuk 6** wordt beschreven dat cholesteroltransport vanuit de levercel naar de gal ook door ontsteking geremd wordt. Hier speelt mogelijk ook een transcriptionele remming een rol bij, nl. die van de expressie van de twee “halftransporters” Abcg5 en Abcg8. Het exacte moleculaire mechanisme blijft echter nog wel onopgehelderd. Het is echter goed mogelijk dat een verminderde activiteit van o.a. de NRs LXR en hepatocyte nuclear factor-4α hier een mediërende rol bij speelt.

*Tot slot* kan geconcludeerd worden dat dit proefschrift laat zien dat NRs aan de ene kant een mediërende rol kunnen spelen bij het optreden van cholestase, bijvoorbeeld bij het ontstaan van ontsteking-geïnduceerde cholestase, en aan de andere kant als mogelijk farmacologische doelwit gebruikt kunnen worden bij de behandeling van cholestatische leverziekten. Hoewel verder onderzoek vanzelfsprekend noodzakelijk blijft, bieden NR-liganden het perspectief dat invulling gegeven kan worden aan de behoefte aan nieuwe behandelingsmogelijkheden voor kinderen met cholestatische leverziekten. Hopelijk kunnen de vooruitzichten van deze patiënten hiermee op termijn sterk verbeterd worden.